



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**ESTUDIO DE LOS FACTORES MITOCONDRIALES Y
AMBIENTALES QUE CONTRIBUYEN A LA SORDERA
POR CISPLATINO.**

Autor: Domingo Graterol Torres.

**Director del Trabajo: Dra. Ana María García Arumí y
Dr. Enrique Perelló Scherdel.**

**Trabajo de investigación descriptivo y observacional.
Convocatoria Junio 2011.**

Servicio de Otorrinolaringología.

**Departamento de Cirugía. Hospital Universitario Vall
d'Hebrón.**



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**ESTUDIO DE LOS FACTORES
MITOCONDRIALES Y AMBIENTALES
QUE CONTRIBUYEN A LA SORDERA
POR CISPLATINO**

Dr. Domingo Graterol Torres

Barcelona, Junio 2011

AGRADECIMIENTOS

A todos los pacientes y a sus familiares porque a pesar de su estado, nos regalaron su tiempo y estuvieron dispuestos a participar en este estudio contribuyendo así, al desarrollo de nuevas líneas de investigación para minimizar los efectos colaterales de terapias oncológicas.

ÍNDICE

1. Justificación del estudio.
2. Introducción.
 - 2.1 Concepto de ototoxicidad.
 - 2.2 Características químicas del cisplatino.
 - 2.3 Mecanismos de acción del cisplatino.
 - 2.4 Concepto de haplogrupo del ADN mitocondrial.
 - 2.5 Haplogrupo del ADN mitocondrial y ototoxicidad.
3. Hipótesis.
4. Objetivos.
5. Material y método.
 - 4.1 Aspectos éticos.
 - 4.2 Población de estudio.
 - 4.3 Criterios de inclusión y exclusión.
 - 4.4 Variables estudiadas.
 - 4.5 Tratamiento estadístico de los datos.
6. Resultados.
7. Discusión.
8. Conclusión.
9. Bibliografía.
10. Anexos.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Es conocido que algunos fármacos pueden lesionar el epitelio sensorial del oído interno, produciendo pérdida auditiva y/o alteraciones del equilibrio, que en algunos casos puede ser de tipo severo e irreversible.

Como factores relacionados con este efecto nocivo se señalan la permanencia del fármaco en el oído interno que depende del tiempo que permanece en la sangre, la cual a su vez depende de la duración de la administración y dosis administrada y de los mecanismos renales de eliminación.

Pero también se sabe que existe una predisposición personal a dichos efectos tóxicos probablemente por mecanismos genéticos que en los últimos años están siendo objeto de investigación.

El cisplatino, es un fármaco utilizado en oncología que puede secundariamente afectar diferentes órganos y al igual que los aminoglucósidos, actúa negativamente sobre las células sensoriales auditivas produciendo daños irreversibles.

En el caso de los aminoglucósidos, se ha demostrado que la ototoxicidad está vinculada a la mutación A1555G, la cual se ha sugerido se expresaría con mayor o menor severidad fenotípica según el haplogrupo del ADN mitocondrial. Se desconoce si esta relación se presenta en el caso de quimioterápicos como el cisplatino.

Por ello, la realización de nuevas investigaciones que aportasen evidencias sobre el tema podría permitir en caso afirmativo identificar a la población susceptible y ofrecer a este grupo alternativas terapéuticas menos lesivas.

2. INTRODUCCIÓN

Concepto de ototoxicidad

La ototoxicidad se define como las alteraciones transitorias o definitivas de la función auditiva, vestibular o de ambas, provocadas por determinados fármacos o por diversas sustancias químicas no farmacológicas (1).

Clínica de la ototoxicidad

Las drogas ototóxicas pueden causar síntomas cocleares y/o vestibulares.

La clínica habitual incluye acúfenos y/o hipoacusia inicialmente en la región de frecuencias desde 4000 a 8000 Hz, aunque también puede extenderse a las frecuencias del habla (2).

En algunos casos se puede presentar síntomas vestibulares acompañando o posterior a los síntomas auditivos. La exploración vestibular de tipo calórico o rotatorio evidencia una respuesta disminuida o ausente del laberinto afectado (1,2).

Fármacos ototóxicos principales

Los productos ototóxicos pueden ser de uso farmacológico y no farmacológico.

Entre los primeros destacan los antibióticos, especialmente los de la familia de los aminoglucósidos (estreptomicina, gentamicina, tobramicina, neomicina y kanamicina principalmente). También hay que destacar otros antibióticos como la polimixina, la minociclina y la vancomicina (1,2). La Tabla 1, muestra los principales fármacos ototóxicos.

AMINOGLUCÓSIDOS.-

La estreptomicina y la gentamicina ejercen su efecto tóxico sobre todo a nivel del sistema vestibular, teniendo un efecto tóxico moderado sobre la cóclea, mientras que la neomicina, kanamicina y amikacina afectan preferentemente a esta última.

Familia de compuestos	Agente	Afección sobre:
Antibióticos aminoglucósidos	Estreptomina Dihidroestreptomina Capreomicina Framicetina Neomicina Gentamicina Tobramicina Amikacina Netilmicina Espectinomicina Kanamicina Paromomicina	Cóclea y vestíbulo En algunos casos, nervio auditivo
Antibióticos macrólidos y afines	Eritromicina Azitromicina Claritromicina Clindamicina Lincomicina	Cóclea
Antibióticos glucopeptídicos	Vancomicina Teicoplanina	Nervio auditivo y vestíbulo
Otros antibióticos	Minociclina Clorafenicol Cefalexina Teicoplanina...	Coclear y/o vestibular
Diuréticos	Furosemida Bumetanida Piretanida Torasemida	Cóclea
Salicilatos	Ácido acetil salicílico Otros salicilatos	Cóclea
Antimaláricos	Quinina Cloroquina Hidroxicloroquina y Primaquina Primetamina	Coclear y/o vestibular
Citostáticos	Bleomicina Cisplatino Vincristina Misonidazol Carboplatino Ciclofosfamida Ifosfamida Metotrexato Dactinomicina Droloxifeno	Coclear y/o vestibular
Bloqueadores Beta -	Propanolol Practolol	Coclear
Adrenérgicos		
Otros	Desferroxiamina Dextropropoxifeno Nortriptilina Imipramina Quinidina	Coclear y/o vestibular

Tabla 1. Principales fármacos ototóxicos.

El mecanismo de acción de la ototoxicidad de los aminoglucósidos se relaciona a la capacidad de acumularse en los fluidos del oído interno gracias a un proceso de transporte activo a través de la estría vascular, siendo su vida media en los líquidos laberínticos (10-12 horas) muy superior a la del plasma (2-3 horas) (1).

Sin embargo esta acumulación no se ha podido correlacionar con la ototoxicidad por lo que debe existir una sensibilidad especial de las células sensoriales. Las personas con la mutación A1555G (gen ARNr 12S) son más susceptibles de daño coclear, esta área es homóloga al área de unión entre bacteria y aminoglucósido (1).

Las células ciliadas externas son las primeras en afectarse y progresa desde la base hacia el ápex y desde la fila interna a la externa de estas células. Después se lesionan las células ciliadas internas, las de sostén y retrógradamente el nervio auditivo (1,2).

A nivel vestibular las células ciliadas tipo I son más sensibles que las de tipo II y progresan de forma similar en las máculas y en las crestas.

MACRÓLIDOS.-

Pueden provocar una hipoacusia reversible. Suele afectar simultáneamente las frecuencias conversacionales y las frecuencias más agudas, por lo tanto el paciente puede detectar más precozmente cambios auditivos, en contraposición a lo que sucede con los aminoglucósidos. Su efecto tóxico guarda relación con la dosis, que no debe ser mayor de 1,5 gr/día si las cifras de creatinina son mayores de 180 mol/l, siendo factor de riesgo la insuficiencia renal o hepática (1).

DIURÉTICOS DE ASA.-

Los diuréticos tipo ácido etacrínico y furosemida son otros fármacos potencialmente peligrosos para el oído. A dosis elevadas, esencialmente en pacientes con una función renal alterada, pueden producir también hipoacusia. Los dos efectos electrofisiológicos sobre el sistema endolinfático son: la inhibición del transporte activo a partir de la negativización del potencial endococlear y una disminución de la permeabilidad de las membranas que supone un incremento en la concentración de Na⁺ en la endolinfa junto con una disminución del K⁺, y que es dosis dependiente (1,2).

SALICILATOS.-

El ácido acetil-salicílico y sus derivados tienen una moderada acción ototóxica, precisándose dosis altas y mantenidas en el tiempo para que produzcan sordera. Estudios histológicos han demostrado la presencia de hemorragias en los conductos semicirculares y en el Órgano de Corti, vasoconstricción de los capilares de la estría vascular y edema de las células endoteliales. Además se ha evidenciado destrucción de las células ciliadas externas y alteraciones mitocondriales de las células estriales (1).

Otros fármacos, como la quinina, cloroquina y quinidina, pueden producir hipoacusia neurosensorial profunda, en ocasiones acompañada de acúfenos.

Las mostazas nitrogenadas, la bleomicina y el cisplatino, todos ellos fármacos antitumorales, también producen ototoxicidad (1,2). La figura 1 muestra el lugar y mecanismo de acción de algunos ototóxicos.

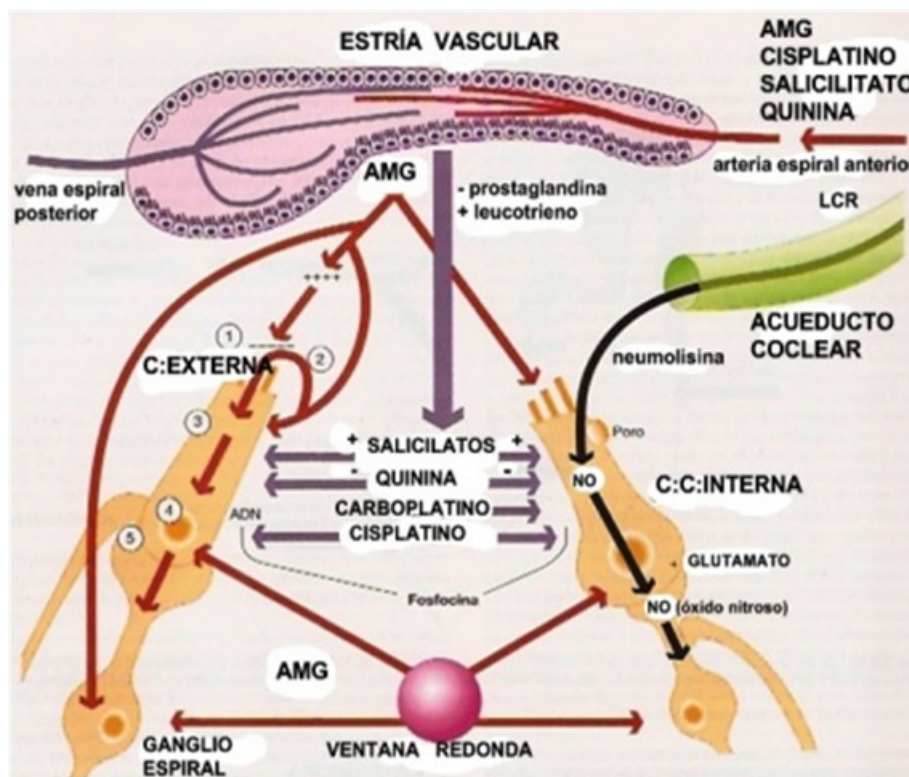


Figura 1. Vías y lugar de acción de algunos ototóxicos.

Características químicas del cisplatino

El cisplatino es el compuesto inorgánico cis-diamino-dicloroplatino (figura 2) en el que el platino se encuentra en estado de oxidación +2, es decir, tiene cuatro enlaces dirigidos hacia las cuatro esquinas de un cuadrado en cuyo centro se encuentra el átomo metálico, formándose así un complejo planar (3).

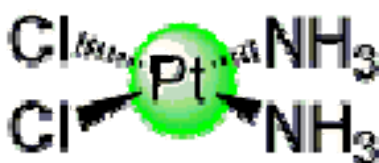


Figura 2. Molécula del Cisplatino.

El platino forma enlaces covalentes, por lo que sus reacciones se asemejan en cierto modo a las reacciones de sustitución del carbono, especialmente a las reacciones de alquilación (3,4).

En el ambiente acuoso de la solución del cisplatino, como se encuentra en los líquidos orgánicos, el platino debe formar enlace covalente con el H₂O, que sustituye así a un Cl⁻, formándose un derivado «acu».

En la concentración de Cl⁻ que existe en el plasma, el cisplatino se puede encontrar en varias formas: dicloro, cloroacu (clorohidroxi) y diacu (dihidroxi) e incluso se pueden formar dipolímeros.

Cualquiera de estas formas tiene capacidad para reaccionar con los productos nucleofílicos que se encuentran en las células.

La reacción directa puede ser importante sólo para los grupos biológicos tio, mientras que los grupos amino reaccionan sólo a través del compuesto acu (3,4).

Aplicaciones terapéuticas del cisplatino

El cisplatino es un agente quimioterápico usado frecuentemente para el tratamiento de un amplio espectro de tumores. Sin embargo, la efectividad terapéutica de esta droga está limitada por sus efectos colaterales, principalmente insuficiencia renal, neuropatías periféricas y ototoxicidad (3,4).

El cisplatino es particularmente útil en el carcinoma de testículo y de ovario, en combinación con otros productos. Tiene cierta actividad en otros carcinomas, como el de células pequeñas del pulmón, estómago, coriocarcinoma, vejiga urinaria, mama, corteza suprarrenal, cuello uterino, útero, cabeza y cuello, pulmón, linfoma no hodgkiniano y osteosarcoma.

Si se da solo, se administra a la dosis de 100 mg/m²; puede hacerse de una vez o repartido en 5 días, repitiéndose los ciclos cada 3 semanas.

Si se da en combinación con otros antineoplásicos, la dosis puede reducirse a 20-30 mg/m² (4).

Mecanismos de acción del cisplatino

El mecanismo de acción antitumoral del cisplatino (figura 3) implica su captación por la célula cancerígena y su reacción con blancos intracelulares (3,4).

En la sangre, donde la concentración de cloruro es relativamente alta, el cisplatino se encuentra principalmente en la forma dicloro neutra.

En el interior de la célula, la baja concentración de cloruro favorece el remplazo de una o ambas fracciones cloruro por agua, resultando una molécula cargada positivamente, cuyo átomo de platino forma enlaces covalentes con los sitios nucleofílicos de las guaninas y adeninas del ADN (3), específicamente en la posición N7 (3).

Lo anterior favorece la formación de entrecruzamientos intrahebra e interhebras en el ADN, correlacionándose la toxicidad del cisplatino con la formación de estos aductos.

Algunos de ellos pueden ser reparados por el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER), pero otros no.

Estas lesiones del ADN por el platino alteran la función de la hebra, bloqueando la replicación del ADN, inducen la detención del ciclo celular en G₂, inhiben la transcripción del ARN y, finalmente, promueven la muerte celular, principalmente a través de la apoptosis, aunque las células tumorales pueden sufrir necrosis *in vitro* cuando son expuestas a altas concentraciones de cisplatino (3,4).

Si bien existe evidencia de que el mecanismo de muerte tumoral es a través de estos puentes en el ADN, la sensibilidad celular a las drogas con platino no siempre se correlaciona con la formación de los aductos.

Es más, los efectos colaterales agudos no están del todo comprendidos, lo que significa que existen otros mecanismos implicados en la toxicidad de la droga.

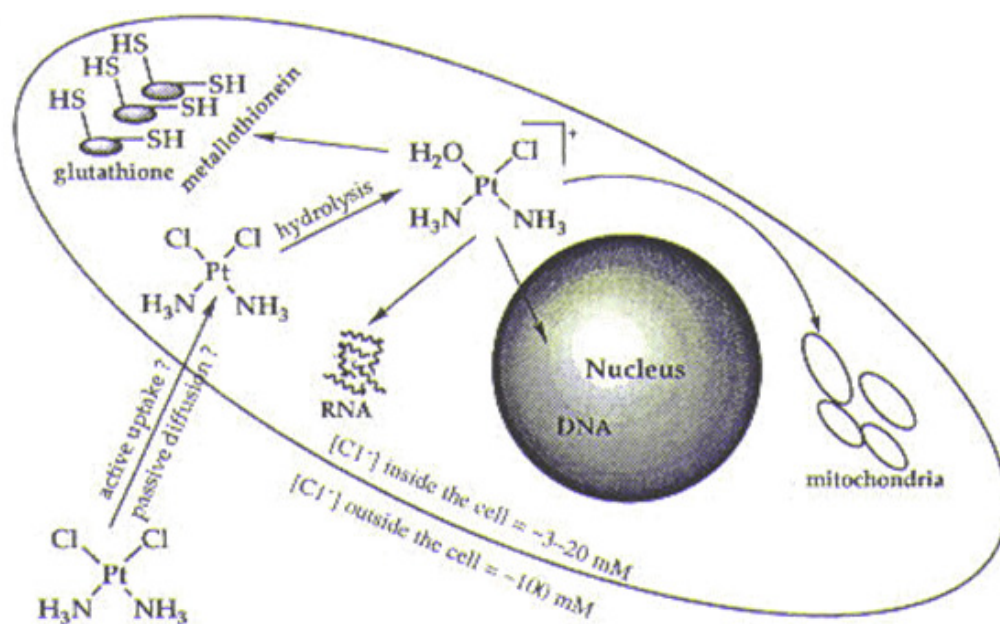


Figura 3. Captación celular del cisplatino y sus objetivos.

Toxicidad del cisplatino

RENAL

Uno de los efectos adversos es la acción nefrotóxica, que afecta los túbulos proximales y distales; la lesión se parece en parte a la que produce el Hg. (5)

La intensidad de la lesión guarda relación con la dosis y puede ser irreversible.

La toxicidad aparece con dosis de 2 mg/kg o 50-75 mg/m², pero se puede evitar mediante abundante hidratación del paciente y diuresis osmótica con manitol.

Desde el punto de vista funcional se aprecia una disminución del aclaramiento de creatinina (mayor que el que corresponde al moderado aumento de BUN y creatinina en plasma), y una marcada pérdida de Mg que puede originar un cuadro agudo de hipomagnesemia que exige su reposición (5).

DIGESTIVA

Las náuseas y los vómitos que produce durante varias horas son de extraordinaria intensidad y exigen la administración abundante de poderosos antieméticos, debiéndose iniciar incluso antes de comenzar la infusión de cisplatino.

AUDITIVA

La ototoxicidad inducida por cisplatino se observa hasta en un 36% de los pacientes que reciben esta droga, dependiendo de la dosis, duración y circunstancias (5) y es una de las causas más frecuentes de suspensión del tratamiento.

La ototoxicidad puede desarrollarse en horas o días después de recibido el tratamiento con cisplatino.

Mecanismo de ototoxicidad por cisplatino

Tradicionalmente se ha aceptado que el principal blanco coclear en la ototoxicidad coclear por cisplatino son las células ciliadas externas, observándose inicialmente la pérdida de

la tercera fila de estereocilios de las células ciliadas externas de la espira basal tras la administración de la droga.

Estudios en animales muestran daño a nivel de la estría vascular y en la vaina de mielina de las células tipo I del ganglio espiral (6).

Sin embargo, un estudio en ratas ha demostrado daño morfológico en las células de sostén, células de Deiter y de Hensen (figura 4). Al parecer, estas células son más sensibles que las células ciliadas externas y la alteración de la ultraestructura de las células de sostén, consistente en microperforaciones irregulares que coalescen hasta formar perforaciones completas, precede a los cambios detectables en las células ciliadas externas.

Se observó, además, que los cambios funcionales, valorados mediante PEATC, se asociaban con la presencia temprana de lesiones apoptóticas en la superficie cuticular de las células de Deiter, respetando las células ciliadas externas que mostraron cambios degenerativos en los estereocilios en animales con una mayor supervivencia a lo largo del estudio (6).

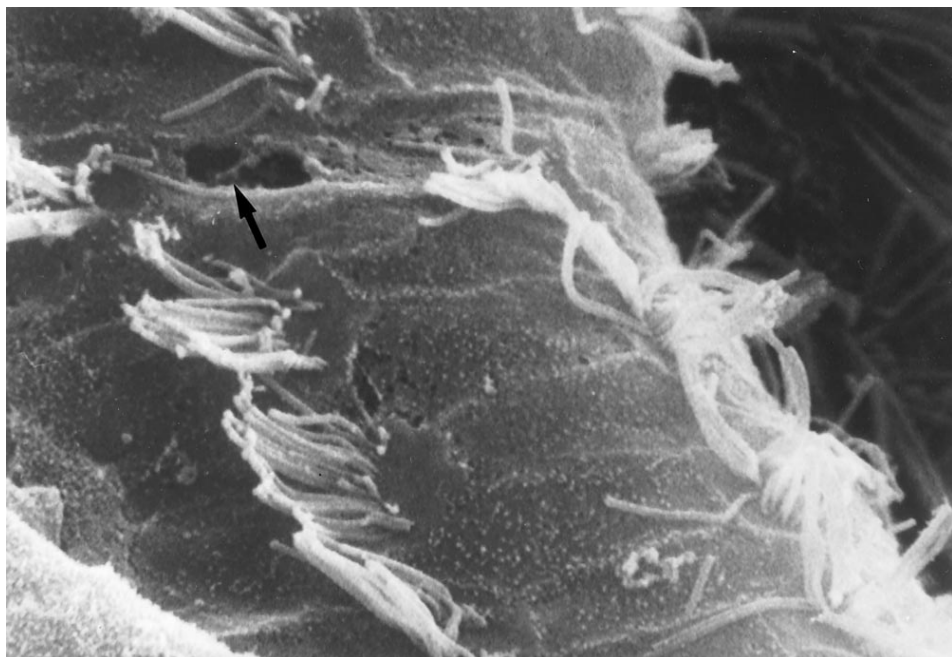


Figura 4. Perforación de la capa cuticular en una célula ciliada externa de la cóclea 15 días después de la administración de cisplatino.

Lo anterior sugiere que el cisplatino afecta inicialmente a las células de sostén, cuya función es mantener la homeostasis metabólica de las células sensoriales especializadas (células ciliadas internas y externas). Estas últimas experimentan lesiones estructurales y funcionales cuando hay un fallo en las células reguladoras de su metabolismo.

Estudios *in vitro* han mostrado que la exposición del neuroepitelio coclear al cisplatino produce oxidantes y depleción de glutatión en las células ciliadas, seguido de muerte de las células ciliadas (4,6).

Las teorías implicadas en la génesis de este estrés oxidativo inducido por el cisplatino incluyen el daño del ADN por el cisplatino, interferencia con el sistema de defensa antioxidante del glutatión o el aumento de la peroxidación de lípidos, lo que lleva a un aumento en la entrada de calcio y apoptosis de las células de la cóclea (5).

Una de las enzimas que produce radicales superóxido es una isoforma de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), la NOX-3, presente únicamente en la cóclea. El cisplatino activa esta enzima, elevando de forma dramática la producción de superóxidos.

Las dos principales vías intracelulares de apoptosis son el receptor de muerte de superficie celular o vía extrínseca, esto es, apoptosis mediada por Fas y por el miembro 1 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1), que implica interacciones de la procaspasa-8, y la vía mitocondrial o intrínseca, regulada por miembros de la familia linfoma de células B-2 (Bcl-2), que normalmente inhibe la muerte celular bloqueando la unión de la caspasa-9 al complejo del factor 1 activador de proteasa apoptótica. Una vez activadas, la caspasa-8 y la caspasa-9 participan en una cascada que culmina en la activación de la caspasa-3, que tiene como resultado la fragmentación del ADN cromosómico y los cambios morfológicos celulares característicos de la apoptosis (5).

Los radicales libres pueden activar Bax (una proteína proapoptótica) en el citosol, que a su vez entra en la mitocondria provocando la salida de citocromo c en el citoplasma. Esto último activa las caspasas 9 y 3, llevando a la ruptura del ADN por la desoxirribonucleasa activada por caspasa y clivaje de la fodrina en la placa cuticular de las células ciliadas externas dañadas por la caspasa-3, induciendo la apoptosis (5).

Otros estudios *in vitro* han demostrado la muerte celular inducida por cisplatino independiente de p53 y de caspasas. Las células expuestas a cisplatino mostraron un aumento en la fosforilación de ERK ½ (kinasa extracelular), causando fragmentación nuclear, reordenamiento del citoesqueleto de actina y muerte celular. Las citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, sufren una regulación al alza por la activación de ERK y el factor nuclear κ B (NF κ B), jugando un rol significativo en el daño coclear inducido por cisplatino (5).

Factores de riesgo de ototoxicidad por cisplatino

Los factores de riesgo útiles para predecir el riesgo de ototoxicidad y su reversibilidad permanecen aún sin determinar.

Pueden favorecer el riesgo de ototoxicidad la dosis acumulada de cisplatino, el ritmo de infusión, la combinación con otras drogas, la edad del paciente y la preexistencia de hipoacusia neurosensorial (7).

Existe una considerable variación individual en la susceptibilidad a la ototoxicidad por cisplatino.

La severidad de la pérdida auditiva parece relacionarse con la dosis acumulada (7). Algunos estudios revelan frecuencias de ototoxicidad inducida por cisplatino entre 20 y 40% después de una dosis total acumulada de 400 mg/m², pero otros investigadores no han observado estos porcentajes.

Los grupos etáreos menores de 5 años y adultos mayores son más susceptibles a sufrir hipoacusia inducida por cisplatino que los adultos jóvenes. Otros factores incluyen insuficiencia renal, hipoacusia preexistente, exposición a ruido y radioterapia (por ejemplo, en carcinoma nasofaríngeo se requieren dosis de radiación coclear sobre 48 Gy).

Otros estudios sugieren la asociación de factores nutricionales, coloración del iris y pigmentación de la piel con el grado de ototoxicidad por cisplatino (8).

Clínica auditiva de la ototoxicidad por cisplatino

El estudio audiométrico de frecuencias altas (8000 Hz hasta 20000 Hz) y de la otoemisiones acústicas de productos de distorsión pueden revelar cambios más precoces en la función auditiva que la audiometría convencional (9).

En el caso de los adultos, se presenta un deterioro de la función auditiva asociada a la edad avanzada, cuya configuración de hipoacusia neurosensorial en frecuencias altas simula el patrón observado en la ototoxicidad por cisplatino, complicando cualquier interpretación de datos audiométricos en su seguimiento. Por ello, es altamente recomendado un estudio audiométrico basal de rutina previo al inicio del tratamiento con cisplatino (7-9).

La pérdida auditiva es dosis dependiente, acumulativa, bilateral y habitualmente permanente y simétrica, aunque estudios en niños han demostrado una afectación asimétrica por cisplatino, con una leve pero significativa mayor afectación del oído izquierdo en frecuencias altas.

Un estudio realizado en niños y adolescentes tratados con agentes quimioterápicos con platino mostró que los cambios ototóxicos se observan primero en la audiometría extendida a altas frecuencias, luego en las otoemisiones acústicas de productos de distorsión y, por último, en la audiometría convencional (9).

Además, este trabajo observó pérdida auditiva después de un período de 50 meses después de haber finalizado la quimioterapia, lo que hace recomendable la incorporación de un estudio audiológico en el seguimiento de rutina de estos pacientes.

El papel de la mitocondria

Las mitocondrias son organelos celulares implicados en vías metabólicas críticas, incluido el metabolismo de energía en forma de ATP.

Contienen su propio sistema genético que codifica un número pequeño de proteínas que forman parte del sistema de fosforilación oxidativa. El resto de las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo. Así, la biogénesis de la mitocondria requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos celulares, el nuclear y el mitocondrial (10).

Aparte de su rol en la producción de ATP celular, estos organelos son efectores de importantes vías apoptóticas. Una inhibición directa de la cadena respiratoria produce una rápida depleción celular de ATP, promoviendo la muerte celular no apoptótica (necrosis). Dado su rol crítico en la supervivencia celular, las mitocondrias son diana de toxinas celulares y agentes quimioterapéuticos (10)

Se ha visto que el cisplatino se acumula en las mitocondrias. Es más, se piensa que estos organelos son un blanco principal de esta droga en las células cancerosas y que alteraciones en la función mitocondrial son responsables de la resistencia tumoral a agentes quimioterápicos.

Por otro lado, los efectos colaterales del cisplatino parecen estar asociados con daño mitocondrial *in vivo* e *in vitro*.

El cisplatino es capaz de alterar de forma directa y significativa la síntesis de ADN mitocondrial y la síntesis y estabilidad del ARN mitocondrial, además de inducir un aumento en los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de glutatión (11).

El glutatión juega un rol crítico en mantener los grupos tioles de las proteínas en un estado reducido (capaces de unirse a cisplatino) y en proteger contra el estrés oxidativo a través de la desintoxicación de oxidantes.

De manera similar, el glutatión puede desintoxicar muchas toxinas exógenas, incluido el cisplatino, a través de la formación de complejos con glutatión.

Los iones de platino que entran en la célula se unen preferentemente al glutatión y a la metalotioneína, ambos presentes en concentraciones milimolar en el citoplasma.

La formación de estos complejos limita la cantidad de droga disponible para unirse al ADN. Por lo tanto, una depleción de glutatión mitocondrial deja al ADN desprotegido contra el daño por cisplatino (11).

Haplogrupos del ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (figura 5) es de herencia materna. Una mutación que surge en las células germinales será transferido al embrión, y todos los hijos de una mujer tendrá una

probabilidad similar a la recepción de la mutación, pero sólo las hijas lo transmitirán. No hay evidencia de transmisión paterna (12).

La tasa de mutación en el ADN mitocondrial es de 10 a 17 mayor que la del ADN nuclear. Esta alta tasa de mutación pudiera explicarse por la carencia de proteínas protectoras como las histonas, a la exposición al daño oxidativo por especies reactivas del oxígeno (hipótesis apoyada por la ubicación física de los ADNmt cerca de la membrana interna donde se generan ROS), y al hecho de que los mecanismos de reparación están poco desarrollados en las mitocondrias (12).

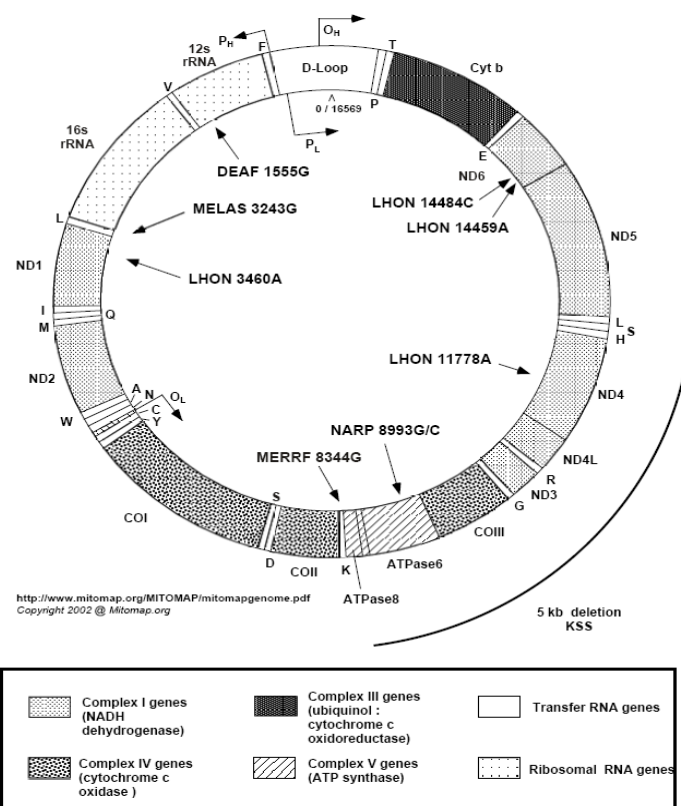


Figura 5. Mapa del ADN mitocondrial.

A lo largo del genoma humano (y también en otras especies) se han identificado multitud de regiones en las que la secuencia no es igual en todas las personas. La forma en que cambia la secuencia de estas regiones es muy diversa. El análisis de la población ha demostrado que para cada una de estas regiones es posible identificar 2 o más formas alternativas o alelos. Por ello se habla de polimorfismos genéticos (11,12).

El polimorfismo genético hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población (13).

Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos (por ejemplo, el color de los ojos) (14).

Un polimorfismo puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada (por ejemplo, la sustitución de una A (adenina) por una C (citosina) o puede ser más complicado, por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de ADN, donde un porcentaje de individuos tenga un determinado número de copias de una determinada secuencia (13,14).

Los cambios poco frecuentes en la secuencia de bases en el ADN no se llaman polimorfismos, sino más bien mutaciones. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer al menos en el 1% de la población (14).

En algunas ocasiones estas regiones polimórficas se sitúan dentro de la secuencia codificante de un gen y cada uno de los alelos puede determinar una variante del producto del gen. En otros casos, su localización es la región promotora, alterando la cantidad y calidad de la expresión del gen. Pero también pueden aparecer en zonas del ADN que no forman parte de los genes (el mal llamado “ADN basura”) de tal modo que los distintos alelos no tienen traducción funcional alguna (al menos conocida).

Un **haplotipo** (del griego *haploos* = simple) es una combinación de alelos ligados a múltiples *loci* que se transmiten juntos, o un conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en una sola cromátida que se encuentran asociados. Se piensa que estas asociaciones, y la identificación de algunos alelos de un haplotipo, permiten identificar el resto de sitios polimórficos en su región. En el estudio de la evolución molecular, un haplogrupo es un grupo grande de haplotipos (13,14).

En genética humana, los haplogrupos más comúnmente estudiados son los haplogrupos del cromosoma Y (ADN-Y) y los haplogrupos del ADN mitocondrial (ADNmt), los cuales pueden ser usados para definir poblaciones genéticas. El ADN-Y tiene la ventaja de ser transmitido solamente a través de la línea patrilineal, mientras que el ADNmt es transmitido solamente a través de la línea matrilineal (12).

Las clasificaciones de los haplogrupos humanos de cualquier clase basados en marcadores genéticos, específicamente por medio de polimorfismos por cambio de un solo nucleótido, o SNP por sus siglas en inglés, han estado evolucionando rápidamente en los últimos años a medida que nuevos marcadores son hallados (13,14).

Mediante el análisis de polimorfismos de restricción enzimática (RFLPs) se pueden encontrar estos SNPs. Los haplogrupos se definirán en función de la presencia o ausencia de dianas de corte por enzimas de restricción debidas a los polimorfismos por cambio de un solo nucleótido. Según si se utilizan más o menos enzimas para hacer el estudio, se obtendrán análisis de restricción de alta o baja resolución, respectivamente (13).

Es poco probable que se produzca la desaparición de un SNP que se haya producido en un momento determinado de la evolución. De este modo, los SNPs se irán acumulando a lo largo del tiempo en la población. Estudiando los SNPs presentes en cada población se pueden hacer grupos, unos descendientes de otros, hasta llegar finalmente a encontrar los ancestros que dieron origen a la población humana: en el caso de los análisis de mtDNA se llega hasta la denominada "Eva mitocondrial" y en el caso de los análisis del cromosoma Y, al "Adán cromosomal-Y".

La mayoría de los polimorfismos que determinan a los haplogrupos son específicos de un continente. Un haplogrupo está codificado con una letra (Ej.; U) mientras que su subgrupo está codificado con un número (Ej. U6).

Alrededor del 99% del ADNmt de Europa Occidental puede ser subdividido en 9 haplogrupos, llamados **H, I, J, K, T, U, V, W y X**, (figura 6) y estos pueden ser agrupados dentro de cuatro grupos: HV, UK, JT y WIX (12).

El grupo **HV**, que experimentó una expansión europea hace aproximadamente 20.000 años, es más frecuente en Europa Occidental que en Europa Oriental y los linajes descendientes del haplogrupo HV original, aparecen en el oriente próximo como resultado de una migración más reciente. Aparece en la población de Europa Occidental aprox. en 50 % de las personas (12).

El grupo **UK**, incluye los haplogrupos U1-U7 y K. El haplogrupo UK es encontrado en toda Europa, y contiene relaciones de linaje muy cercanas indicando una reciente expansión de población. El origen del haplogrupo K se estima hace 16.000 años, y se ha sugerido que los individuos con este haplogrupo tomaron parte en la expansión poblacional pre-neolítica que siguió al último período glaciario. En Europa Occidental constituye el 25% de la población.

El grupo mitocondrial **J** contiene muchos sublinajes. El haplogrupo original J, se originó en oriente medio aproximadamente hace 50.000 años. En Europa, sublinajes de este haplogrupo tienen una distribución diferente e interesante, apareciendo hasta en un 9 % de Europa Occidental. El haplogrupo J es considerado uno de los linajes que tomaron parte en la expansión de la agricultura en Europa y Oriente medio aproximadamente hace 10.000 años. El haplogrupo **T** se cree que tuvo vida hace aproximadamente 17.000 años en el norte de Italia y sus descendientes se expandieron por toda Europa. Supone aproximadamente el 8 % de la población del Oeste Europeo.

El grupo **W**, Se considera hermano de los haplogrupos R, I, X, y A. Aparece en Europa y al este y sur de Asia. En todos los sitios en donde se encuentra constituye un grupo minoritario con una alta concentración en el norte de Pakistán. El haplogrupo **I**, es detectado con muy baja frecuencia a través de Europa y Asia con una fuerte representación en el norte y oeste de Europa.

El haplogrupo **X** también es encontrado en una baja proporción en Europa y Asia, y se cree que migró hace unos 15.000 años a América. Estos tres haplogrupos suponen menos del 4 % de la población Europea.

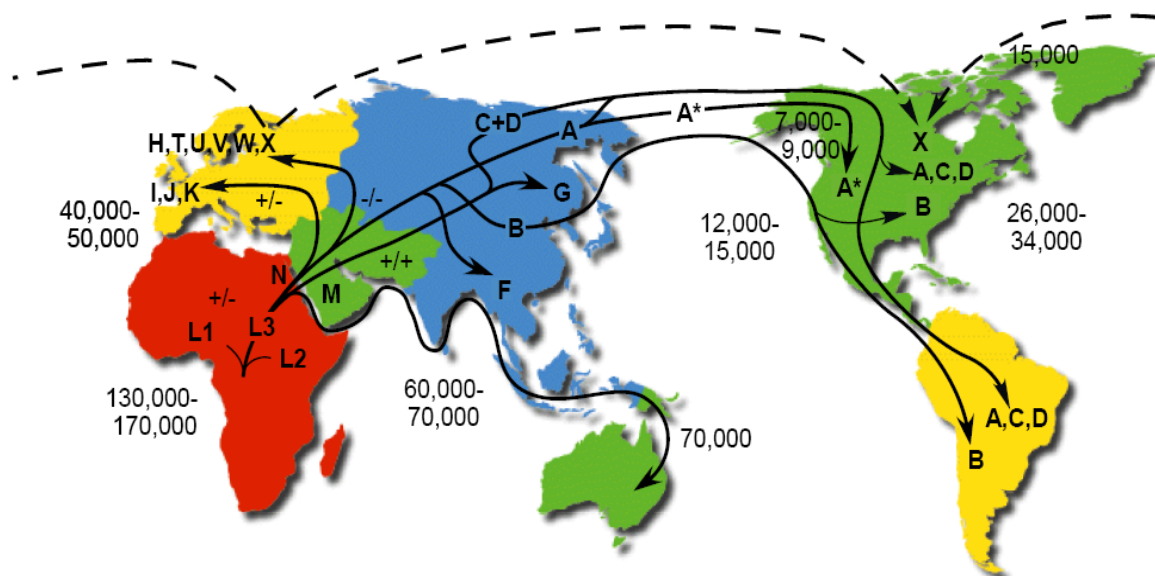


Figura 6. Mapa de las migraciones humanas según ADN mitocondrial.

Ciertas mutaciones en el ADN mitocondrial puede causar enfermedades o fenotipos clínicos por sí solos, pero algunas pueden causar enfermedad sólo en presencia de un factor adicional. Un ejemplo de una mutación patogénica que necesita un factor adicional es la A1555G. Las mutaciones secundarias en el ADN mitocondrial pueden aumentar la penetración de una mutación causante de una enfermedad, por ejemplo, la penetrancia de la mutación A7445G en el tARN^{ser}, que causa sordera, se incrementa en presencia de tres sustituciones adicionales. Del mismo modo, se han encontrado mutaciones que aumentan la penetración de la neuropatía óptica hereditaria de Leber (12).

Predisposición genética a la ototoxicidad por cisplatino

Ciertas mutaciones en el ADN mitocondrial, pueden causar enfermedades o fenotipos clínicos por si solos, otras pueden causar enfermedad solo con la presencia de un factor adicional (14).

La predisposición genética a sufrir pérdida auditiva inducida por cisplatino puede estar relacionada con mutaciones mitocondriales o polimorfismos en enzimas importantes en la depuración de oxidantes.

Así, se ha observado que ciertos pacientes con ototoxicidad por cisplatino pertenecen al poco frecuente haplogrupo mitocondrial Europeo J, que se ha asociado a la atrofia óptica hereditaria de Leber (15).

También, pacientes con cáncer testicular tratados con quimioterapia con cisplatino han mostrado diferencias en los efectos de este fármaco en relación a diferentes polimorfismos funcionales para la glutatión-S-transferasa (GST). Estas transferasas inactivan productos finales endógenos formados como metabolitos secundarios durante el estrés oxidativo.

Dado que muchos genes de la GST son polimórficos, ha habido considerable interés en determinar si variantes alélicas particulares se asocian a un mayor riesgo de una variedad de enfermedades.

De estas clases de GST, cinco (GSTM1, GSTM3, GSTT1, GSTP1 y GSTZ1) han mostrado una distribución polimórfica.

Cinco genes de clase-mu (GSTM1-GSTM5) se sitúan en el cromosoma 1. Los polimorfismos que se han identificado en GSTM1 son GSTM1*0, GSTM1*A y GSTM1*B.

- GSTM1*0 está ausente y los homocigotos (genotipo nulo GSTM1) no expresan proteína.
- GSTM1*A y GSTM1*B difieren en una sola base, y la efectividad catalítica de las enzimas codificadas por estos alelos es similar.

Hay dos clases de genes theta, GSTT1 y GSTT2, localizados en el cromosoma 22.

- GSTT1 está representado por dos alelos: un alelo funcional o salvaje (GSTT1*1), y uno no funcional o alelo nulo (GSTT1*0). Estudios han demostrado que el alelo GSTT1*0 corresponde a una delección total o parcial del gen, ocasionando un déficit en la actividad enzimática (16).

Los polimorfismos de delección en GSTM1 y GSTT1 que conllevan la ausencia de GSTM1 y de GSTT1 ocurren en el 50% y el 20% de la población blanca, respectivamente. El polimorfismo de nucleótido simple en el par de bases 313 en GSTP1, entre adenosina y guanina, lleva a la expresión de, ya sea isoleucina (Ile) o valina (Val) en el codón 105, y con ello a una alteración de la actividad catalítica de la enzima (16).

La mayoría de los polimorfismos genéticos no causan cambios reconocibles en el organismo en el que ocurren. Sin embargo, se observó, en un estudio con pacientes con cáncer testicular tratados con cisplatino, que la presencia de ambos alelos ¹⁰⁵Val-GSTP1 parece conferir protección contra la pérdida auditiva por cisplatino. El riesgo de obtener un pobre resultado auditivo era más de cuatro veces mayor en pacientes con ¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile-GSTP1 o ¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Ile-GSTP1. Dichos genotipos podrían indicar una limitada cantidad de glutatión disponible para la desintoxicación del cisplatino (17).

También se ha observado, a través de estudios de polimorfismos de nucleótido simple, que la presencia del alelo-A de rs2075252 de la megalina, una lipoproteína de baja densidad expresada en las células del túbulo proximal del riñón y en las células marginales del oído interno, es mayor en pacientes tratados con cisplatino y que presentaron alteraciones auditivas (17).

3. HIPÓTESIS

La ototoxicidad del cisplatino está vinculada al tipo de haplogrupo del ADN mitocondrial de los pacientes.

4. OBJETIVOS

Objetivo Principal

Determinar si el tipo de haplogrupo del ADN mitocondrial condiciona mayor afectación auditiva en pacientes sometidos a tratamiento con cisplatino.

Objetivos Secundarios

- Determinar si otros factores conocidos de pérdida auditiva aumentan este grado de afectación y cuál de ellos es el que más significación tiene.
- Determinar el tipo de curva audiométrica más característico de la pérdida auditiva por cisplatino.

5. MATERIAL Y MÉTODO

Aspectos éticos

El estudio se llevó a cabo siguiendo las normas de la sociedad española de bioética y ética médica y previo consentimiento y aprobación por parte del comité ético de nuestro hospital. Se explicaba a cada paciente la naturaleza del estudio y se le solicitaba la firma del consentimiento informado (anexo 1).

Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 18 años, con enfermedad oncológica que serán tratados con cisplatino y que firman consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Pacientes que ya hayan iniciado tratamiento con cisplatino.
- Pacientes que requieran quimioterapia combinada con otros fármacos.
- Pacientes que no terminaron el tratamiento por complicaciones o fallecimiento.
- Pacientes con enfermedad otológica concomitante.
- Pacientes con GAP auditivo en la audiometría tonal entre vía ósea y aérea superior a 5 dB.

Población y muestra

Se incluyeron en el estudio a los pacientes visitados y tratados durante el período de tiempo comprendido entre Enero del 2009 y Enero del 2011 que por su enfermedad oncológica requerían iniciar tratamiento quimioterápico con cisplatino, excluyendo todos aquellos que requerían quimioterapia combinada, que ya hubiesen iniciado el tratamiento o que requiriera algún tratamiento antineoplásico concomitante.

Del total de 30 pacientes incluidos inicialmente fueron excluidos 4 pacientes por presentar complicaciones derivadas de su enfermedad y/o fallecimiento.

Variables estudiadas

Los datos fueron recogidos de forma confidencial (Anexo 2) y se obtuvo información de cada paciente:

- Edad y sexo.
- Antecedentes médicos y quirúrgicos, haciendo énfasis en la presencia de factores de riesgo cardiovascular (HTA, cardiopatía, dislipemia).
- Tratamientos médicos crónicos.
- Hábito tabáquico o enólico.
- Pérdida auditiva previa.
- Enfermedades otológicas.
- Exposición laboral a ruido.

Estudio Auditivo

Realizado con audiómetro de frecuencias (125-8000 Hz) MAICO, modelo MA51.

PROTOCOLO

Se realizó una audiometría tonal liminar (ATL) y verbal (AV), 3 días previos del inicio del tratamiento y a la semana posterior a la tercera dosis de quimioterapia.

- Cálculo de la pérdida auditiva global en ATL

Para el cálculo de la pérdida auditiva se tomaron en cuenta las frecuencias 125-8000 Hz. Se obtenía el valor promedio en decibelios de estas frecuencias tomadas por vía aérea de la visita previa y posterior al tratamiento. Posteriormente se restaban ambos promedios. Se tomó la vía aérea como referencia para el cálculo de la pérdida siempre y cuando no existiera un GAP mayor a 5 dB entre la vía aérea y la vía ósea. Se consideró pérdida auditiva a partir de una disminución en el promedio superior a 10 dB.

- Cálculo de la pérdida en altas frecuencias en ATL

Dado que la pérdida auditiva por ototoxicidad es principalmente en altas frecuencias, se realizó el mismo procedimiento para el cálculo de la pérdida auditiva pero sólo tomando en cuenta las frecuencias de 4000 y 8000 Hz.

Se consideró pérdida auditiva significativa a partir de una disminución en el promedio superior a 10 dB.

- Cálculo de la pérdida auditiva en la AV

Se determinaron los parámetros de la logaudiometría: UDV (umbral de detección verbal), UDP (umbral de detección de la palabra) y URV (umbral de recepción verbal) previo al inicio del tratamiento y al final del mismo. Posteriormente se calculó la pérdida obteniendo la diferencia entre ambas visitas en estos valores. Se consideró pérdida auditiva significativa a partir de una disminución en el promedio superior a 5 dB.

- Estudio genético

Método de extracción y análisis del ADN mitocondrial

Extrajimos el ADN mitocondrial de todas las muestras citológicas (recogida celular por cepillado de la mucosa yugal del paciente), bajo la dirección y supervisión del grupo de investigación en patología mitocondrial y neuromuscular del Institut de Recerca del Hospital “Vall d’Hebron”, siguiendo el siguiente protocolo:

- Se coloca la muestra citológica en un tubo de microcentrifugación de 2 ml y se añade 400 µl de PBS a la muestra.
- Se añade a la muestra 20 µl de solución de proteasa QIAGEN y 400 µl de Buffer AL.
- Se incuba a 56°C durante 10 minutos.
- Se añade a la muestra 400 µl de etanol (96-100%) y se mezcla.
- Se coloca la mezcla en un tubo de 2 ml y se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto.

- Se añade 500 µl de Buffer AW1 y se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto.
- Se añade 500 µl de Buffer AW2 y se centrifuga a velocidad máxima (20,000 x g; 14,000 rpm) durante 3 minutos.
- Se añade 150 µl de Buffer AE o agua destilada, se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y luego se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto.

Determinación del haplogrupo H

PCR: amplificación de la región 6469-7315 del mtADN.

Primer Forward: 5' CTCTTCGTCTGATCCGTCCT 3'.

Primer Reverse: 5' AGCGAAGGCTTCTCAAATCA 3'.

Todas las PCR del haplotipaje se realizarán en estas condiciones: el producto de PCR se digierá con el enzima AluI (New England Biolabs), cuya diana es la posición 7028. Si no corta, es haplogrupo H; si corta, no es haplogrupo H. El producto de la digestión se corre en un gel de agarosa al 2% y se visualiza con bromuro de etilio.

Determinación del haplogrupo J

PCR: amplificación de la región 13338-14268 del mtADN.

Primer Forward: 5' ACATCTGTACCCACGCCTTC 3'.

Primer Reverse: 5' AGAGGGGTCAGGGTTCATTC 3'.

El producto de PCR se digiere con el enzima BstNi (New England Biolabs) para analizar la diana 13708 del mtADN. Si no corta, es haplogrupo J; si corta, no es haplogrupo J.

<u>Determinación de los haplogrupo U-K</u>
PCR: amplificación de la región 11948-12772 del mtADN.
Primer Forward: 5' TATCACTCTCCTACTTACAG 3'.
Primer Reverse: 5' AGAAGGTTATAATTCCTACG 3'.

El producto de PCR se digiere con el enzima Hinf (New England Biolabs) para analizar la diana 12308 del mtADN. Si corta, es haplogrupo U-K; si no corta, no es haplogrupo U-K.

Con la determinación de los haplogrupos H, J y U-K se abarca aproximadamente un 75-80% de los haplogrupos de la población española.

Quimioterapia

A todos los pacientes del estudio se le administró la misma dosis de cisplatino, 100 mg/m², según el protocolo del servicio de oncología médica de nuestro hospital, en intervalos de 3 semanas entre dosis (día 1-21-42) hasta cumplir 3 dosis.

Tratamiento estadístico de las variables

Se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos obtenidos, mediante las pruebas de correlación de variables independientes, así como también el análisis multivariante con la finalidad de encontrar alguna asociación estadísticamente significativa entre las variables estudiadas y la pérdida auditiva.

Todos los análisis se llevaron a cabo bajo la supervisión de la unidad de soporte y análisis estadístico para la investigación del instituto de recerca de nuestro hospital.

6. RESULTADOS

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Se obtuvieron datos epidemiológicos, audiométricos y genéticos de 30 pacientes oncológicos y requirieron tratamiento con cisplatino en el período de tiempo comprendido entre Enero del 2010 y Enero del 2011. Se excluyeron del estudio 4 pacientes por no poder completar el seguimiento por mal estado general o por fallecimiento.

1. Muestra

La tabla 2 muestra edad, sexo y localización de la neoplasia de los 26 pacientes incluidos.

Paciente	Edad	Sexo	Localización de la neoplasia
1	70	M	Maxilar inferior
2	34	H	Cavum
3	69	H	Vejiga
4	73	H	Vejiga
5	30	M	Amigdalas
6	77	H	Maxilar
7	67	H	Vejiga
8	36	H	Seminoma
9	82	H	Trígono retromolar
10	62	M	Suelo de boca
11	49	M	Vejiga
12	77	H	Laringe
13	61	H	Orofaringe
14	55	M	Laringe
15	67	M	Cérvix Uterino
16	60	M	Paladar blando

17	59	H	Seno Piriforme
18	74	H	Maxilar
19	73	H	Cavum
20	27	H	Seminoma
21	28	H	Testículo
22	64	H	Cuello
23	65	M	Cuello
24	57	H	Labio inferior
25	76	H	Maxilar
26	77	H	Maxilar

Tabla 2. Sexo, edad y localización de la neoplasia.

Del total de 26 pacientes, 18 eran hombres y 8 mujeres, con un rango de edad de 27 a 82 años y con un promedio de edad de 60,3 años. El 61,5 % de los pacientes se ubicaron en la franja de edad comprendida entre los 60 y 82 años.

2. Antecedentes personales

- **HÁBITOS TÓXICOS**.- El tabaco fue el más frecuente, presentándose en 19 pacientes (73.1%); seguido por el café (14 pacientes) y por el alcohol (6 pacientes).
- **ENFERMEDADES SISTÉMICAS**.- La HTA fue la patología más frecuente, presentándose en 8 pacientes (30.8%); seguida por la diabetes mellitus (6 pacientes). El antecedente de cardiopatía, EPOC y TBC, sólo se presentó en 1 paciente, respectivamente.
- **HIPOACUSIA**.- Sólo 9 pacientes (34,6 %) presentaron algún grado de hipoacusia previa, y 8 pacientes refirieron trabajar en ambiente ruidoso.

PÉRDIDA AUDITIVA

- ATL.- Promedio de pérdida (125-8000 Hz) del OD fue 7.4 dB mientras que del oído izquierdo fue de 8.2 dB. El promedio de pérdida tomando en cuenta sólo frecuencias agudas (4000-8000 Hz) fue algo mayor, siendo de 18 dB en OD y 18,63 en OI.
- AV.- La pérdida en los parámetros de la logaudiometría fue de 4.1 dB en el UDV, 4 dB en la UDP y 4,3 dB en el URV. La tabla 3 muestra la pérdida auditiva en decibelios en la ATL y en la audiometría verbal.

Paciente	Promedio de pérdida en ATL OD (dB)	Promedio de pérdida en ATL OI (dB)	Pérdida en UDV	Pérdida en UDP	Pérdida en URV
1	27,5	15	5	2	6
2	52,5	55	2	2	2
3	12,5	22,5	8	8	8
4	7,5	6,5	4	4	2
5	3,5	4,5	4	4	6
6	5	4	4	4	4
7	20	22,5	8	8	8
8	0	15	0	0	0
9	42,5	35	0	2	2
10	17,5	17,5	6	4	2
11	30	20	8	10	12
12	20	15	8	8	10
13	25	35	4	0	0
14	5,5	5	0	0	2
15	5,5	5	4	4	2

16	28	30	8	4	4
17	28,5	30	2	4	4
18	26,5	28,5	4	4	6
19	5,5	5	6	6	4
20	15	17	2	2	4
21	2,5	3,5	0	0	0
22	25	28	6	4	4
23	20	17,5	8	6	8
24	30	32,5	2	4	4
25	7,5	8,5	2	4	4
26	5,2	6,5	4	6	6

Tabla 3. Pérdida auditiva en la ATL y en la audiometría verbal.

El grupo de pacientes que presentó una pérdida significativa (>10 dB) en el valor promedio de las frecuencias 125-8000 Hz estuvo constituido por 11 pacientes (42,3 %).

El grupo de pacientes que presentó una pérdida significativa (>10 dB) en el valor promedio de las frecuencias agudas (4000-8000 Hz) estuvo constituido por 16 pacientes (61,5 %).

HAPLOGRUPOS DEL ADN MITOCONDRIAL

El haplogrupo HV fue el más frecuente presentándose en 16 pacientes (61.5%), seguido por el UK con 6 pacientes (23.1%), el WXI con 3 pacientes (11,5 %) y finalmente el JT con sólo 1 paciente (tabla 4).

Paciente	Edad	Sexo	Haplogrupo
1	70	M	UK
2	34	H	UK
3	69	H	HV
4	73	H	HV
5	30	M	HV
6	77	H	HV
7	67	H	W,X,I
8	36	H	HV
9	82	H	HV
10	62	M	HV
11	49	M	W,X,I
12	77	H	HV
13	61	H	UK
14	55	M	HV
15	67	M	JT
16	60	M	UK
17	59	H	HV
18	74	H	HV
19	73	H	UK
20	27	H	HV
21	28	H	HV
22	64	H	UK
23	65	M	W,X,I
24	57	H	HV

25	76	H	HV
26	77	H	HV

Tabla 4. Distribución de los haplogrupos del ADNmt.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Debido al número reducido de pacientes, los análisis estadísticos son limitados y procede en este caso realizar un análisis descriptivo de los datos obtenidos, más que buscar la significación estadística de los mismos.

- Pérdida auditiva y edad y sexo.- Al comparar las diferencias entre los grupos, pérdida auditiva significativa *versus* no pérdida auditiva, la distribución de sexo y edad fue similar en ambos.
- Pérdida auditiva y hábitos tóxicos.- El hábito tabáquico se presentó de manera similar en ambos grupos al igual que el hábito enólico y el consumo de café.
- Pérdida auditiva y enfermedades sistémicas.- Tomando en cuenta los antecedentes patológicos, la HTA se presentó de forma más frecuente en el grupo de pacientes que no presentaron pérdida auditiva significativa (40% vs. 25%), siendo esta diferencia no significativa desde el punto de vista estadístico.
- Pérdida auditiva y exposición a ruido e hipoacusia previa.- Obtuvimos que estas variables se presentaban de forma similar en ambos grupos.
- Pérdida auditiva y haplogrupos del ADNmt.-

De los 11 pacientes, que presentaron una pérdida significativa tomando como referencia las frecuencias 125-8000 Hz, 5 pertenecían al grupo HV, 4 al grupo UK y 2 al WXI (tabla 5).

La distribución fue similar en los 16 pacientes que presentaron una pérdida significativa tomando como referencia las frecuencias agudas (4000-8000 Hz), 8 pertenecían al grupo HV, 5 al grupo UK y 3 al WXL.

No se encontró relación, estadísticamente significativa entre los haplogrupos y la pérdida auditiva; sin embargo, obtuvimos que el 66.7% de los pacientes pertenecientes al grupo UK e igual porcentaje de los pertenecientes del grupo WXL presentaron una pérdida auditiva significativa, seguidos por el grupo HV con 31.3%.

Si consideramos la pérdida en las frecuencias altas, obtuvimos que el 100% del grupo WIX presentó una pérdida auditiva significativa, mientras que el 83 % del grupo UK y el 56% del grupo HV, presentaron una pérdida > 10 dB.

Haplogrupos	Pacientes con pérdida auditiva significativa	% dentro del grupo de pérdida auditiva	% dentro del haplogrupo
HV	8	50	50
UK	5	31,3	83,3
WIX	3	18,7	100

Tabla 5. Pérdida auditiva según haplogrupos.

7. DISCUSIÓN

Ciertas mutaciones en el ADN mitocondrial, pueden causar enfermedades o fenotipos clínicos por si solos, otras pueden causar enfermedad solo con la presencia de un factor adicional, como se ha sugerido, pero todavía no se ha confirmado, en la ototoxicidad por administración de los aminoglucósidos de la mutación A1555G.

La ototoxicidad inducida por cisplatino está siendo estudiada ampliamente desde hace algunos años.

Entre un 40 y 70 % de los pacientes tratados con esta droga presentan algún grado de pérdida auditiva (18), hecho que pudimos constatar en nuestro estudio, obteniendo que el 61,5% de los pacientes presentaron una pérdida auditiva significativa. Este hecho es dependiente de la dosis, duración y circunstancias (18) y es una de las causas de suspensión del tratamiento más frecuentes.

La pérdida auditiva es por lo general bilateral y simétrica, fenómeno que pudimos constatar, pues la afectación auditiva en nuestro estudio fue simétrica con diferencias mínimas entre ambos oídos, aunque estudios en niños, que no han sido incluidos en nuestro trabajo, han demostrado una afectación asimétrica por cisplatino, con una leve pero significativa mayor afectación del oído izquierdo en frecuencias altas (18,19).

La afectación auditiva es predominantemente en frecuencias altas (19), aunque puede presentarse en frecuencias graves y explicaría la discordancia entre la logaudiometría y la audiometría tonal en esos casos.

Al conservarse las frecuencias conversacionales, no existe una afectación significativa en las audiometrías verbales.

El estudio audiométrico de las frecuencias altas (8000 Hz hasta 20000 Hz) y de las otoemisiones acústicas de productos de distorsión puede revelar cambios más precoces en la función auditiva que la audiometría convencional (20).

Un estudio realizado en niños y adolescentes tratados con cisplatino mostró que los cambios ototóxicos se observan primero en la audiometría extendida a altas frecuencias, luego en las otoemisiones acústicas de productos de distorsión y, por último, en la audiometría convencional (20).

Aunque se realizó estudio de los productos de distorsión en nuestra serie no han sido incluidos en el presente trabajo ya que no pudimos obtener resultados valorables debido a la señal de ruido y a la dispersión de las variables probablemente debidas a las patologías oncológicas presentadas.

Los adultos mayores son más susceptibles a sufrir hipoacusia inducida por cisplatino que los adultos jóvenes. Otros factores que incluyen son la insuficiencia renal, la hipoacusia preexistente o la exposición a ruido. Otros estudios sugieren la asociación de factores nutricionales, coloración del iris y pigmentación de la piel con el grado de ototoxicidad por cisplatino (21).

Sin embargo, no se pudo determinar si alguna de las variables estudiadas aumenta el riesgo de pérdida auditiva con el cisplatino debido al tamaño de la muestra estudiada y a la poca frecuencia con la que se presentaron dichas variables.

La predisposición genética a sufrir pérdida auditiva inducida por cisplatino puede estar relacionada con mutaciones mitocondriales. Se ha observado que ciertos pacientes con ototoxicidad por cisplatino pertenecen al poco frecuente haplogrupo mitocondrial Europeo J, que se ha asociado a la atrofia óptica hereditaria de Leber (22). De igual forma pacientes con cáncer testicular tratados con quimioterapia con cisplatino mostraron diferencias en polimorfismos funcionales para la glutatión-S-transferasa (GST), enzima perteneciente a una importante familia de enzimas de fase II del metabolismo de drogas.

En nuestro estudio no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los haplogrupos del ADN mitocondrial y la pérdida auditiva por cisplatino. Sin embargo, observamos que todos (3) los pacientes pertenecientes al poco frecuente grupo WIX (<2% de los haplogrupos europeos), presentaron una pérdida auditiva significativa, dato que cobra mayor interés si lo comparamos con el porcentaje de pacientes con pérdida auditiva significativa pertenecientes al haplogrupo más frecuente en Europa y en nuestro estudio, el grupo HV, el cual fue de 56%.

Además, observamos que el 83% de los pacientes pertenecientes al grupo UK presentaban una pérdida auditiva significativa. Esto nos lleva a pensar que, la pérdida auditiva

producida por cisplatino pudiera estar en relación con los haplogrupos europeos minoritarios, como el UK y el WIX.

No fue posible obtener información del haplogrupo JT, debido que solo se trataba de un paciente el cual no perdió audición.

El número limitado de pacientes, no permitió realizar un análisis que tuviera alguna significación estadística, sin embargo, los datos recogidos en este estudio que muestran la mayor pérdida auditiva en grupos minoritarios sugieren que debería seguirse estudiando en esta línea.

8. CONCLUSIONES

1. No hemos podido determinar si otros factores conocidos de pérdida auditiva aumentan el riesgo de ototoxicidad producida por el cisplatino.
2. La ototoxicidad producida por cisplatino se manifiesta como pérdida auditiva predominantemente en frecuencias altas.
3. No hemos podido establecer una relación entre la ototoxicidad producida por cisplatino y los haplogrupos del ADN mitocondrial.
4. Sin embargo, el porcentaje de pacientes con afectación auditivas fue mayor en los haplogrupos minoritarios.
5. Es necesario estudios con mayor número de casos para confirmar o rechazar estos resultados.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **SUAREZ C., GIL-CARCEDO LM., MARCO J., MEDINA JE., ORTEGA P., TRINIDAD J.** Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. Editorial médica panamericana. Segunda edición. Tomo 2. Cap. 112. Pág. 1646-1662.
2. **ENCICLOPEDIA MÉDICO-QUIRÚRGICA DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y PATOLOGÍA CERVICOFACIAL.** Editorial Elsevier Masson. Tomo 2. Cap. 20-184. Pág. 5-12.
3. **RYBAK L. P.** Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 15:364-369
4. **AL-KHATIB T., COHEN N., CARRET AS., DANIEL S.** Cisplatinum ototoxicity in children, long.term follow up . *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 Aug;74 (8):913-9.
5. **GARCÍA-BERROCAL J. R., NEVADO J., RAMÍREZ-CAMACHO R., SANZ R. ET AL.** The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *British Journal of Pharmacology.* 2007; 152:1012-1020.
6. **RAMÍREZ-CAMACHO R., GARCÍA-BERROCAL J. R., BUJÁN J., MARTÍN-MARERO A., TRINIDAD A.** Supporting Cells As a Target Of Cisplatin-Induced Inner Ear Damage: Therapeutic Implications. *Laryngoscope.* 2004; 114:533-537.
7. **NAGY J. L., ADELSTEIN D. J., NEWMAN C. W. et al.** Cisplatin Ototoxicity: The Importance of Baseline Audiometry. *Am. J. Clin. Oncol.* 1999; 22:305-308.
8. **RADEMAKER-LAKHAI J. M., CRUL M., ZUUR L., BAAS P. ET AL.** Relationship Between Cisplatin Administration and the Development of Ototoxicity. *J Clin Oncol* 2006; 24:918-924.
9. **DE ALMEIDA C., UMEOKA WG., VIERA RC., MORAES IF.** Frequency Audiometric Study in Cancer-Cured Patients Treated with Cisplatin. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008;74:382-90.

10. **MONTOYA, J.** Biogénesis y Patología Mitocondrial. Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza. 2005; 60: 7-28.
11. **GARRIDO N., PÉREZ-MARTOS A., FARO M. ET AL.** Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. *Biochem. J.* 2008; 414, 93-102.
12. A compendium of polymorphisms and mutations of the human mitochondrial DNA. www.mitomap.org.
13. **FISCHEL-GHODSIAN N., KOPKE R. D., GE X.** Mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Mitochondrion.* 2004; 4:675-694.
14. Genes en pedigrees. U.S National Library of Medicine. National Institutes of Health.
15. **R. STEPHANIE HUANG, SHIWEI DUAN, SUNITA J. SHUKLA ET AL.** Identification of Genetic Variants Contributing to Cisplatin-Induced Cytotoxicity by Use of a Genomewide Approach. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 81:427-437.
16. **OLDENBURG J., KRAGGERUD S. M., CVANCAROVA M., LOTHE R. A., FOSSA S. D.** Cisplatin-Induced Long-Term Hearing Impairment Is Associated With Specific Glutathione-S-Transferase Genotypes in Testicular Cancer Survivors. *J Clin Oncol.* 2007; 25:708-714.
17. **ÜNAL M., GÜVEN M., DEVRANOĞLU K., ÖZAYDIN A. ET AL.** Glutathione S transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are related to the risk of primary open-angle glaucoma: a study in a Turkish population. *Br J Ophthalmol.* 2007; 91:527-530.
18. **SCHMIDT C. M., KNIEF A., LAGOSCH A. K., DEUSTER D., ZEHNHOFF-DINNESEN A.** Left-Right Asymmetry in Hearing Loss Following Cisplatin Therapy in Children – The Left Ear is Slightly but Significantly More Affected. *Ear & Hearing.* 2008; 29:830-837.
19. **BERG A. L., SPITZER J. B., GARVIN J. H.** Ototoxic Impact of Cisplatin in Pediatric Oncology Patients. *Laryngoscope.* 1999; 109:1806-1814

20. **KNIGHT K. R., KRAEMER D. F., WINTER C., NEUWELT E. A.** Early Changes in Auditory Function As a Result of Platinum Chemotherapy: Use of Extended High-Frequency Audiometry and Evoked Distortion Product Otoacoustic Emissions. *J Clin Oncol* 2007; 25:1190-1195.
21. **ALVES M. LIUZ, Y COLS.** Ototoxicidade da cisplatina: serie de casos. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2007;53(4):370-3.
22. **PETERS U, PREISLER-ADAMS S, LANVERS-KAMINSKYC, ET AL.** Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity in the ototoxic effect if cisplatin. *Anticancer Res* 2003; 23:1249-1255.

ANEXO 1.



Servicio ORL

Título del estudio: **ESTUDIO DE LOS FACTORES NUCLEARES, MITOCONDRIALES Y AMBIENTALES QUE CONTRIBUYEN A LA SORDERA POR CISPLATINO**

Yo (nombre y apellidos) _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con la doctora: **ANA MARÍA GARCÍA ARUMÍ**

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1 Cuando quiera
- 2 Sin tener que dar explicaciones
- 3 Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Punto 1: ☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para participar en el estudio **ESTUDIO DE LOS FACTORES NUCLEARES, MITOCONDRIALES Y AMBIENTALES QUE CONTRIBUYEN A LA SORDERA POR CISPLATINO**

Punto 2: ☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra citológica de la mucosa oral se almacene para utilizarla en otros estudios sobre factores genéticos relacionados con la ototoxicidad producida por cisplatino. Mi muestra se identificará con un número codificado, y mi identidad se mantendrá en secreto.

Fecha y firma del participante

Fecha y firma del investigador

ANEXO 2.

RECOGIDA DATOS OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO

1.- DATOS PERSONALES Y ANTECEDENTES:

Nombre _____ Sexo _____ Edad _____

NHC _____ Teléfono _____ Peso _____ Altura _____

Tabaco _____ Alcohol _____

Cafeína _____ Otros _____

Medicamentos habituales _____

() HIPOACUSIA FAMILIAR: _____

() HTA () DM () DLP () CARDIOPATÍA

OTRAS:

AUTOINMUNES _____

VASCULITIS _____

NEUROLOLÓGICAS _____

OTOLOLÓGICAS _____

OTOTÓXICOS _____

EXPOSICIÓN RUÍDO (años, trabajo) _____

() AMBIENTE SILENCIOSO

() NIVEL TOLERABLE

() AMBIENTE CON MUCHO RUÍDO

SORDERA (tiempo) _____

Audioprótesis (tiempo) _____

() VÉRTIGO () INESTABILIDAD () ACÚFENOS () graves ()
agudos

2.- EXPLORACIÓN FÍSICA Y PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

OTOSCOPIA () normal

() anormal:

1ª - fecha

(Hz)	250	500	1000	2000	3000	4000	6000	8000
D O								
I O								
OD G								
OI G								

2ª- fecha

(Hz)	250	500	1000	2000	3000	4000	6000	8000
D O								
I O								
OD G								
OI G								

AUDIOMETRÍA VERBAL:

1ª- fecha:

2ª- fecha: